

Streptococcus lactis の L-form の 研 究

—— 塩要求株と塩非要求株との比較 ——

三 浦 健 司

札幌医科大学微生物学講座 (主任 林 喬義教授)

札幌医科大学外科学第1講座 (主任 早坂 滉教授)

Studies on the L-form of Streptococcus lactis

— A comparison between high osmolarity requiring-
and non requiring- L-form —

Kenji MIURA

Department of Microbiology, Sapporo Medical College

(Chief: Prof. T. T. A. Hayashi)

Department of Surgery (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief: Prof. H. Hayasaka)

L-form was derived from one of the strains of streptococcus lactis (Group N Streptococcus No. 7963) by the penicillin gradient method. The high osmolarity not requiring L-form strain (designated as N 05, tentatively) was isolated from the culture of the above-mentioned L-form strain (designated as N 35, tentatively) according to the method described by S. Maekawa in our laboratory previously.

The differences of the metabolic activities between these two kinds of L-form strain were investigated and the following results were obtained.

1. Both strains acquired the ability to grow in broth without an addition of serum and penicillin during the course of the successive culture of more than 50 times.

2. N35 requires high osmolarity of the medium for a luxuriant growth and the optimum concentration of NaCl in the broth for growth was 3.5~4.7%. However, N05 can grow in the ordinary broth containing 0.5% NaCl and the optimum concentration of NaCl in the medium for growth was 0.9~2.1%.

3. The quantities of lactic acid produced by the resting cells of these L-form using glucose as a substrate were estimated as the indicator of the metabolic activities of the L-form cells, and it was noted that N05 cells showed higher metabolic activities than N35 as a result of estimation of lactic acid produced per mg protein of these cells.

4. Each L-form strain was separated into the following 2 groups of cells by differential centrifugation; namely large cells and small cells, and the small cells of either of N35- or N05-cells showed a higher metabolic activity than the large cells of either of N35- or N05-cells respectively.

5. Since N35 cells could not maintain their complete cell structure in the hypotonic buffer solution, it was impossible to compare the metabolic activity of N35 cells with that of N05 cells in the same hypotonic reaction mixture that was suitable for the estimation of the activity of N05 cells. Therefore, the lower activity of N35 cells than that of N05 cells might not be a substantial difference of the character of these cells themselves, but it should be considered that it may arise from the inhibitory action of a high concentration of NaCl in the reaction mixture used for the test of activity of N35 cells.

6. From examination of electron micrographs the mechanism of acquiring the resistance of the cell membrane of N05 cells against low osmolarity could not be elucidated as yet.

(Received May 2, 1978 and accepted June 6, 1978)

1 緒 言

細胞壁をもたない細菌の異常型 (aberrant form) と考えられている L-form は親株の細菌と異なり、培地の滲透圧に対して抵抗が弱く、低張な液の中では菌体の破壊されることが知られている¹⁻⁵⁾。このために親株からの L-form の誘導ならびに、分離された L-form の増殖に用いられる培地には滲透圧を保持するために塩類の添加を必要とする。多くの例ではこの目的のために 3% 食塩を培地に添加している。β 型溶血を示すレンサ球菌の L-form の誘導の方法については古くは Sharp の報告⁶⁾ があるが、それによると L-form の誘導には penicillin gradient 法が L-form の出現効率が良く、かつ分離が容易であるとされているが、われわれも A 群溶血レンサ球菌の L-form の分離にあたっては Sharp の方法⁶⁾ にならって行い、良い結果を得ている。

しかし人為的な L-form の誘導ではなく、治療を目的に投与された抗生物質などの作用によって生体内で自然に L-form が出現した場合、L-form の菌体保持に必要な滲透圧より低い生理的条件下では、はたして生存、発育が可能かどうか疑われていた。Streptococcus pyogenes の L-form の *in vitro* の研究結果から、親株に証明される種々の菌体外産生物質をはじめ、病原性と密接な関係があるとされている菌体成分である M-蛋白の産生も証明されていることから^{7,8)}、生体内での病原性の存在も当然考えられるところである。しかし L-form の病原的意義を知るための動物実験の報告では L-form の菌体は滲透圧に対する抵抗が弱く、生理的条件下で容易に菌体が破壊されるため、その生体内での病原性についてはまだ明らかにされていない。したがってこの問題解決のために L-form の塩要求株から、生理的条件下で菌体が破壊されず、低滲透圧の環境下でも発育するように適応させた L-form、すなわち塩非要求性の L-form の誘導を試み、教室の Maekawa and Hayashi⁹⁾ は Streptococcus pyogenes S 8 株 (group A) の L-form について塩非要求株の分離に成功している。このような目的で塩非要求株の分離については低張液中での抵抗性の程度の差はあるが Leon and Panos¹⁰⁾ および Gilpin and Patterson¹¹⁾ も他の菌株について報告している。

著者は L-form の塩要求株と塩非要求株の比較を目的として、非病原性のレンサ球菌である Streptococcus lactis の塩要求性 L-form から Maekawa and Hayashi の報告⁹⁾ にしたがって、塩非要求株の分離培養に成功したので、今回はこの両変異株について、特に乳酸産生能を指標として代謝活性を比較し、さらに両者の形態の差異を電顕的に比

較した結果を報告する。

2 実験材料および実験方法

2.1 菌株：東大医科研より分与を受けた Streptococcus lactis 7963 株を用いて L-form を誘導分離した。菌株の植え継ぎには血液斜面寒天培地を使用した。

2.2 St. lactis の L-form 誘導と株化：Sharp の方法に準拠した Penicillin gradient 法で L-form を誘導し、分離した。すなわち St. lactis の Todd Hewitt Broth の 37°C、20 時間培養菌液の 0.2 ml を予め用意された L-form 分離用 (後述) の平板寒天培地の全面にコンラージ棒を用いて塗布する。この plate は直ちに培地辺縁より 45×5 mm の大きさに寒天を切り取って溝を作る。この溝に少量の寒天溶液を流し込み底部をおおい、さらに結晶 Penicillin G ナトリウム溶液 0.06 ml (120 u 含有) を注入する。このようにして準備された Penicillin gradient plate を一枚ずつ嫌氣的に培養を行った¹²⁾。嫌氣的条件を作るのには、ピロガール末と炭酸ナトリウム末の同量を混和した粉末 4 g を葉包紙に包み、寒天平板シャーレと同径の空のシャーレの中に置き上述の準備された培地のシャーレを、上から寒天表面を下に向けて重ね、シャーレの辺縁接触部をビニールテープで巻いて密封した。この状態で 37°C、5 日間培養後、5~20 倍で顕微鏡により L-form の colony を観察した。出現部位は penicillin 濃度勾配により生じた発育阻止部と発育部の丁度境界部に通常の colony の性状とは異なり、表面顆粒状、辺縁不規則で培地内に侵入している L-form の特異な colony をみることができた。その L-form colony の存在する寒天部分を切り出し、Penicillin 1,000 u/ml を含有する軟寒天 (0.1%) L-form 用培地へ移し、37°C で培養、2~3 日間隔で植え継いだ。発育の状態により継代の間隔を短くし、37°C、20 時間で明らかな濁りが観察できるようになり、50 代継代培養後 Penicillin を含まない培地に移しても親株への復帰は認められなかった。また、この頃には、分離当初は必要であった牛血清を培地から除いても発育には殆んど影響がなくなった。

分離株化した St. lactis L-form (かりに N 35 と名付ける) の継代保存には、3% tryptic soy broth+0.5% yeast extract+3.0% NaCl (最終濃度 3.5%) の組成の塩要求性 L-form 培地を用いた。

2.3 塩要求性 (3.5% NaCl) L-form (N 35) から塩非要求性 L-form の誘導：上述のように St. lactis L-form (N 35) は、発育に osmotic stabilizer として 3.5% NaCl を必要とし、一般の細菌培地では全く発育しない。このような塩要求性 L-form の継代培養に際し、培地中の NaCl 濃度を 3.5% から徐々に減少させた培地を用いて継代馴化

させ、最終 0.5% NaCl 含有の普通培地に発育する L-form (かりに N 05 と名付ける) を分離した。この継代保存には、N 35 L-form 用培地から NaCl 3% を除いた他は同一組成の培地を用いた。

本実験の実施にあたり、N 35, N 05 の両 L-form の継代保存および実験のための培養温度は、*St. lactis* の至適温度 30°C に変更した。

2.4 N 35, N 05 両 L-form の large cells と small cells の分別：液体培地に培養した両 L-form は遠心分離法で large cells と small cells group に分別し、実験に供した。

すなわち、全培養を 3,500 r.p.m., 10 分間遠心して沈澱する菌体を large cells とし、その上清をさらに 10,000 r.p.m., 30 分間遠心して沈澱する菌体を small cells とした。細胞壁を有する菌体と異なり、遠心沈澱した L-form 菌体は均一な浮遊液になりにくかったが、フラッシュミキサーまたは駒込ピペットの吸引、吹き出しにより、できる限り均一な浮遊液にし実験に供した。

2.5 乳酸産生またはブドウ糖消費測定の実験条件：*St. lactis* およびその L-form である N 35, N 05 の両 L-form の乳酸産生またはブドウ糖消費の測定は次の条件下で行った。おのおの L-form 培養の培地と同一濃度の NaCl 添加リン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗滌後、同一の緩衝液で浮遊液を調製した。この菌液に 0.1 M ブドウ糖溶液を 0.02, 0.01 M になるように添加し、30°C 恒温槽中で反応させた。反応の停止には、反応液と同量の 20% TCA 溶液を反応液に加え、遠心沈澱で菌体を除去し、上清に存在する乳酸量またはブドウ糖量を測定した。

2.6 定量法：乳酸の測定は Barker and Summerson 法¹³⁾に準拠した。ブドウ糖の測定には o-Toluidine 法^{14~17)}に、蛋白量の測定は Lowry 法¹⁸⁾に従った。

ブドウ糖および乳酸の測定数値は、すべて反応に用いられた菌体蛋白量当りの量で表現した。すなわち per mg 蛋白量の比活性値を記載した。

2.7 浸透圧の測定：試薬、培地などの浸透圧は Osmette A 型浸透圧計を用いて測定した。

2.8 pH の測定：試薬、培地などの pH の測定には Beckman Zeromatic SS 3 型を用いた。

2.9 電子顕微鏡写真の作製：N 35, N 05 の両 L-form の大小の細胞の電子顕微鏡用の材料は下記の方法で作製した。

L-form 菌体は、塩要求株は 4% NaCl 液で、塩非要求株は 0.85% NaCl 液で遠心洗滌し、おのおの菌体を 2% Gluturaldehyde 溶液で 4°C, 60 分前固定、さらに 1% Osmic acid で 60 分後固定を行い、エポン樹脂包埋して薄

切し、酢酸ウランおよび酢酸鉛で染色、電子顕微鏡写真撮影し観察した。

3 実験成績

3.1 L-form N 35 (塩要求株) と L-form N 05 (塩非要求株) の液状培地中での発育の比較

L-form N 35, N 05 の発育を比較するにあたり、前者には Yeast extract 加 Tryptic soy broth 培地に 3% NaCl を加え、後者には NaCl を加えない培地を用いた。

おのおのの培養は 30°C, 10 時間前培養したものを 20% の割合に接種し、30°C で 11 時間培養を行った。培養液を Fig. 1 に示したように継時的に汲み出して Klett-Summerson 光度計で濁度を、同時に pH メーターでその時の pH を測定した。N 35 は培養後約 3 時間で最高濁度の 85 KSR (Klette-Summerson's reading) に至るのが観察された。一方 N 05 の発育は、N 35 に比べ著しく悪く、培養 5 時間後に最高濁度 30 KSR を示すに過ぎなかった。最高濁度の比較から N 05 の発育は N 35 の発育の約 1/3 であった。

両 L-form の発育曲線からわかるように、N 05 の発育は最高濁度に達してから、明らかな濁度の減少がみられ、濁度の減少傾向は 30~60 分続き、濁度が最高値の約 1/2 の 15 KSR まで減少するのが観察され、その後はその値を維持した。

上述の L-form の発育に伴う培地の pH の変化は、図にみられるように培養開始時の pH は、N 35 では pH 6.6, N 05 では pH 6.7 で培養時間の経過とともに漸次酸性に移行し、それぞれの最終 pH は 5.7 と 5.5 に達した。発育曲線の上では N 05, N 35 の両者に明らかな差がみられたが、

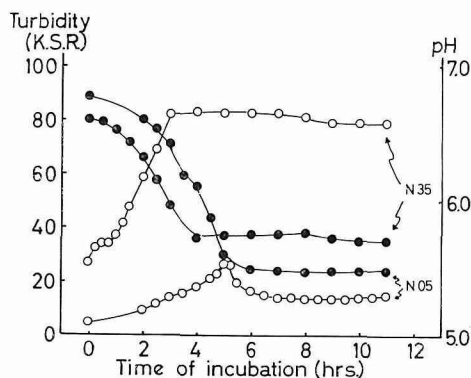


Fig. 1 Growth curves and changes in pH during the course of culture of N 35 or N 05 in broth containing suitable concentration of NaCl for each strain.

Open circle: turbidity. Closed circle: pH.

培地の pH の酸性化傾向は、両者はほぼ平行しており、ブドウ糖代謝に大きな差異があるとは考えられない。繰り返しの実験結果でも、最終 pH は N 35 より N 05 の方が常に低く、Fig. 1 の実験の場合は 0.2 低い値を示した。

3.2 L-form N 35 (塩要求株) と L-form N 05 (塩非要求株) の発育可能な塩濃度と至適濃度の比較

L-form の N 35 株と N 05 株をそれぞれの培地に 10 時間、前培養したものを予め NaCl が各濃度に含まれる培地に 20% の割合に接種し、30°C で培養して経時的に濁度の変化を KSR で記録した。各々の培地の食塩濃度は、0.5, 0.9, 1.3, 1.7, 2.1, 2.3, 2.7, 2.9, 3.5, 3.9, 4.7% に調製した。各種塩濃度の培地に発育した最高濁度で N 35, N 05 の両者を別々に比較した成績を Fig. 2, 3 に示した。N 35 株では NaCl 濃度 3.5%, 3.9%, 4.7% 含有培地内での発育には差異が無く、最高濁度 65 KSR であったが、NaCl 濃度 2.7% で明らかに発育が悪く、2.3% ではさらに悪く濁度は

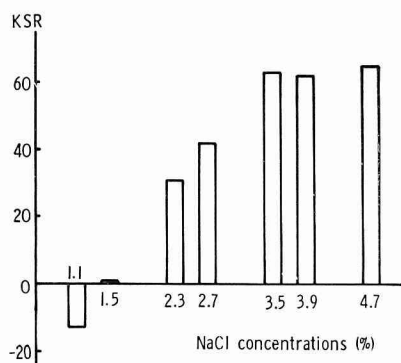


Fig. 2 Maximum turbidities, indicated by KSR, of culture of N 35 strain in the media containing various concentrations of NaCl.

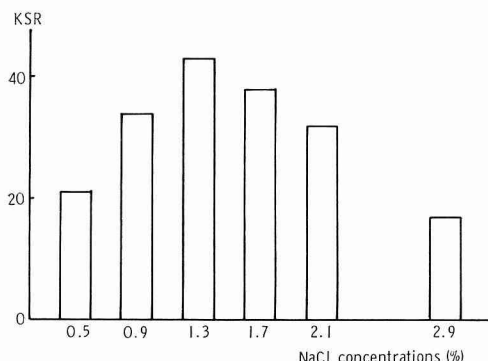


Fig. 3 Maximum turbidities, indicated by KSR, of culture of N 05 strain in the media containing various concentrations of NaCl.

最高時の半分であった。NaCl 濃度 1.5% では全く発育がみられなかった。このように N 35 株では NaCl 濃度が 3.5% より高い培地では発育に対して特に悪い影響はみられないが、3.5% より低い濃度では明らかに発育が悪く、NaCl 濃度の発育におよぼす影響は顕著であった。低張液中での濁度の低下は L-form の細胞破壊による死滅のためと思われる。

N 05 株の発育は、継代培養されている 0.5% NaCl 濃度より高い 0.9, 1.3, 1.7, 2.1% の NaCl 濃度の培地での発育がむしろ良かった。最高濁度を示した NaCl 1.3% の培地の発育は NaCl 0.5% 含有培地の約 2 倍であった。培地の NaCl 濃度をさらに高めて 2.9% とすると明らかに発育の低下がみられ、それ以上の濃度では図示していないが極めて悪く 5 KSR 以下であった。

以上の結果から発育の至適 NaCl 濃度は、N 05 株では 1.3%, N 35 株では 3.5% であった。

ちなみに両 L-form の親株である *St. lactis* では、培地中の NaCl 濃度 0.5% と 3.5% とでは、その発育に差がみられなかった (Fig. 4)。

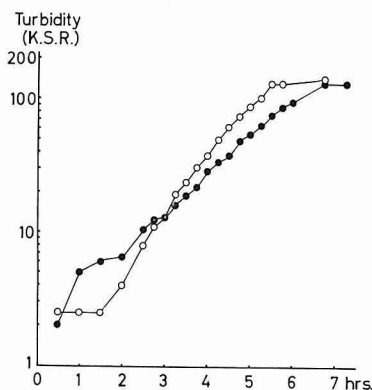


Fig. 4 Growth curves of parent strain in the broth containing 3.5% NaCl or 0.5% NaCl.

Open circle: 0.5% NaCl. Closed circle: 3.5% NaCl.

3.3 N 35 株の低張液中における osmotic shock

Fig. 5 に示したように N 05, N 35 両 L-form 細胞を、NaCl を 0.5% および 3.5% 含む緩衝液に一定の濁度に揃えて浮遊させ、濁度の経時変化を観察した結果、NaCl を 0.5% 含む培地に継代培養された N 05 株を NaCl 0.5% を含有する緩衝液に浮遊させた場合、濁度の変化は 80 分で数 % の低下を示すのみであったが、NaCl 3.5% 含有緩衝液中に浮遊させた場合、濁度は徐々に低下し、80 分間で約 20% の減少を示した。

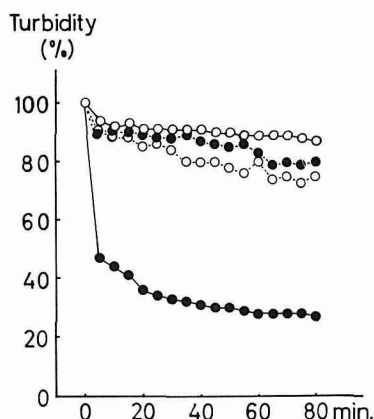


Fig. 5 Effect of low osmolarity on N35 and N05 cells.

Open circle: N05 strain. Closed circle: N35 strain. Solid line: NaCl 0.5% buffer. Broken line: NaCl 3.5% buffer.

一方 N35 株の細胞は外界の浸透圧の変化に非常に鋭敏で、0.5% NaCl 加緩衝液の低浸透圧の下で数分後に約50%の濁度の急激な減少がみられた。以後30分まで徐々に減少を続けながら80分の時点で70%の濁度の減少を示した。このような急激な濁度の低下は浸透圧による細胞破壊のためと思われる。

3.4 N35 と N05 両 L-form の乳酸産生能の比較

(1) NaCl 濃度 0.5% と 3.5% 含有の反応液中での両 L-form 株の large cells の乳酸産生量の差異:

N35, N05 の各 L-form 30°C, 10時間培養細胞の 3,500 r.p.m., 10分間遠心沈澱細胞について比較した成績を Fig. 6, 7 に示した。

その結果 N05 の場合は NaCl 濃度 0.5%, N35 では 3.5% の反応条件下の方が高い乳酸産生値が得られた。

単位蛋白量当りの比活性値をおおのの最適条件で比較すると、N05 large cells は N35 large cells より明らかに高い値を示し、約3倍強であった。

(2) 両 L-form の 0.5%~3.5% の間の各種塩濃度条件下での乳酸産生能の比較:

N05, N35 両 L-form を large cells と small cells の2種に分け、乳酸産生能を比較検討した。

実験は各 L-form の細胞の一定浮遊液に一定量のブドウ糖を基質として加え、30°C, 60分後の乳酸産生量を比較し、その結果を Fig. 8, 9, 10 に示した。

N35 large cells の場合は、NaCl 濃度の高い 3.5% で最高値を示し、反応時の NaCl 濃度の低下とともに乳酸産生量は低下し、NaCl 濃度 3.0% ですでに比活性値で 1/2 に低下した。それ以下の NaCl 濃度での乳酸産生低下はさほ

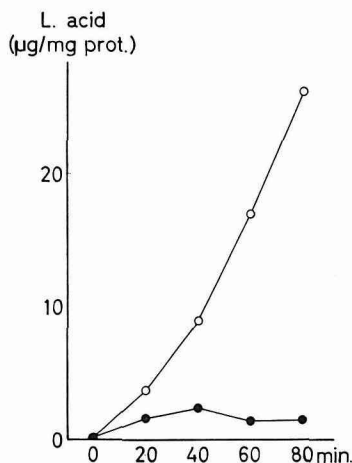


Fig. 6 The quantity of lactic acid produced at various points of incubation time by large cells of N35 in 2 different kinds of buffer containing 0.5% or 3.5% NaCl using glucose as a substrate.

Open circle: 3.5% NaCl. Closed circle: 0.5% NaCl.

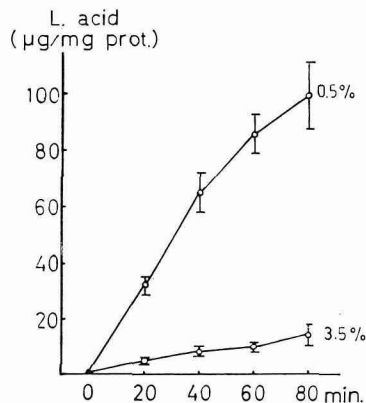


Fig. 7 The quantity of lactic acid produced at various points of incubation time by large cells of N05 in 2 different kinds of buffer containing 0.5% or 3.5% NaCl using glucose as a substrate.

ど著しくなく、3.0% 時の比活性値とほぼ同一のレベルが保たれた (Fig. 8)。N35 small cells の各種塩濃度における比較実験は、細胞の収量の低いのに加え、細胞浮遊液の作製段階で実験3に示した osmotic shock のために細胞が破壊されてしまい測定できなかった。

N05 を大小の細胞に分け、それぞれの各種 NaCl 濃度での乳酸産生量を測定し、30°C, 60分の比活性値を比較すると Fig. 8, 10 に示したように、発育に適当な範囲の塩濃

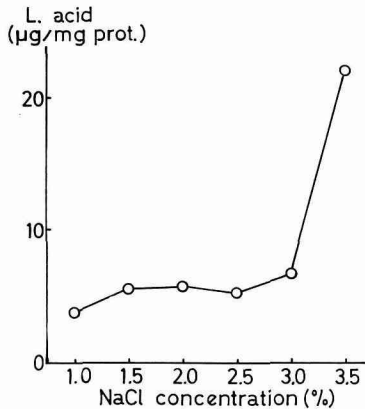


Fig. 8 Metabolic activities of large cells of N 35 in the phosphate buffers containing various concentrations of NaCl.

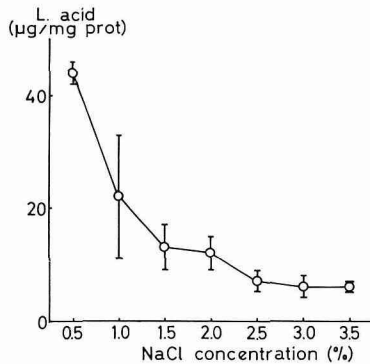


Fig. 9 Metabolic activities of large cells of N 05 in the phosphate buffers containing various concentrations of NaCl.

度で明らかに高い値を示した. large cells と small cells との間には, 最高値を示す NaCl 濃度に差がみられ, 前者は NaCl 0.5% で最高値を示し, NaCl 濃度の増加とともに乳酸産生量は漸減した. 一方後者では NaCl 濃度 0.5% の条件下より 1.0% で最高値を示した. この差異の原因については目下検索中である.

N 05 の大小の細胞の比較でいえることは, 各塩濃度全体を通じて small cells の比活性値が高く, また small cells の場合は塩濃度の差異, すなわち滲透圧増加による比活性の低下は large cells の場合より小さかったことである.

以上の実験成績から, N 05, N 35 の両 L-form の大小の細胞の乳酸産生量をそれぞれの L-form の継代培養に用いる NaCl 濃度の条件で比較した結果を Table 1 に総括的に表わした. すなわち乳酸産生能は, large cells より small cells の方が高く, また N 35 (塩要求株) より N 05 (塩非

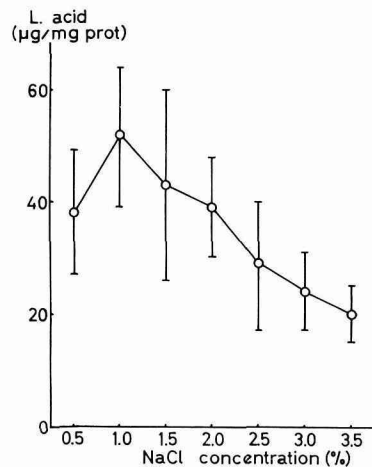


Fig. 10 Metabolic activities of small cells of N 05 in the phosphate buffers containing various concentrations of NaCl.

Table 1 Comparison between the metabolic activity of large cells and that of small cells in the case of N 35 or N 05 strain

	S. cell	L. cell
N 35	59 ± 14	38 ± 12
N 05	114 ± 18	74 ± 24

L. acid (μg/mg prot.)

要求株) の方が高いという結果が得られた.

3.5 N 35, N 05 両 L-form の親株である *Streptococcus lactis* の各種塩濃度の条件下での乳酸産生能の検討

先の実験で示したように *St. lactis* の増殖は NaCl 濃度 0.5% と 3.5% の濃度差による差異はみられなかったが, NaCl 濃度 0.5% から最終 3.5% まで 0.5% 間隔の反応条件下での乳酸産生能を比較してみると, *St. lactis* の前培養の NaCl 濃度を, 0.5% と 3.5% の 2 種にして培養した菌体を用い, 各 NaCl 濃度を異にした反応条件で検討した成績では, *St. lactis* の前培養時の NaCl 濃度に関係なく, 反応時の NaCl 濃度 0.5% の条件での乳酸産生値が最も高く, NaCl 濃度の増加とともに乳酸産生値は低下した. すなわち, NaCl 0.5% の条件下で最高の比活性値 258 μg が証明されたが, 3.5% の条件下では約 1/2 に低下し, 130 μg であった (Fig. 11). このように parent strain の比活性値は L-form の場合の最も高い比活性値の約 2 倍であった.

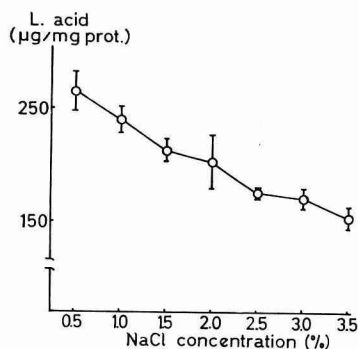


Fig. 11 Metabolic activities of *St. lactis* (parent strain) in the phosphate buffers containing various concentrations of NaCl.

3.6 N 35 (塩要求株) と N 05 (塩非要求株) L-form の 大小の細胞の電顕的観察

30°C, 10時間培養 N 35, N 05 両 L-form をそれぞれ遠心沈澱で大小の細胞に分別し, 超薄切片を作製して電顕的に形態を観察した. 各種の細胞の形態の数例を Photo 1, 2, 3, 4 に示した.

N 35, N 05 共に細胞膜で被われた楕円形から円形の, 大小様々な大きさの細胞から成っているが, N 35 の L-form には周囲が smooth な円形の細胞の多いのに比し, N 05 の L-form には形態の irregularity の多い細胞が多数みられた.

また, 細胞内に存在する中等度の electron dense の顆粒が N 35 では compact なのに比し N 05 ではやや粗ざうであり, どちらの細胞にも細胞内に electron dense な粒子が一つの細胞中に数個ずつ細胞膜に接近して散在している. この粒子は N 35, N 05 のいずれにも認められるが, 大小の細胞を問わず N 05 の方にやや多いように思われる. このような電顕写真からは膜構造の検討までは不可能であるので, 塩非要求株の浸透圧に対する抵抗性の増加の原因を形態的に追究することはできなかった.

また電子顕微鏡写真の像から, それぞれの L-form の大小の細胞の大きさを測定して比較するために, 密着プリント上で無作意に 300 個ずつの細胞の長径と短径を測定し, その平均値を細胞の大きさの表現の目安とした. このようにして測定した各細胞の大きさの平均値を Table 2 に示した. この結果 N 05 (塩非要求株) L-form が, N 35 (塩要求株) L-form よりやや大きい値を示した.

細胞の大きさの平均値を大きな順から列記すると N 05 の large cells, N 05 の small cells, N 35 の large cells, N 35 の small cells の順序であった.

Table 2 The mean diameters of large cells and that of small cells measured on electron micrographs in the case of N 35 or N 05 strain

N 05	L. cell	2795.2 ± 1301.2 (nm)
	S. cell	2192.8 ± 686.7
N 35	L. cell	1988.0 ± 674.7
	S. cell	1409.6 ± 433.7

4 考 按

細菌の親株から L-form を誘導する際にも, また誘導された L-form を植え継ぐ際にも血清および高濃度の食塩を必要とするが, その L-form を漸次食塩濃度の低い培地に継代培養して行くと同時に血清も除いた培地に馴化させ, 遂には食塩濃度 0.5% の ordinary broth だけで発育する L-form の得られることは教室の Maekawa and Hayashi の *Streptococcus pyogenes* S 8 株を用いて行った報告⁹⁾ があり, また Clasener *et al.*¹⁹⁾ や Fernandes and Panos²⁰⁾ も *Streptococcus pyogenes* で, Gilpin and Patterson¹¹⁾ は *B. subtilis* で L-form の塩非要求株の誘導分離を報告している. しかしながら, 本来の塩要求性の L-form と塩非要求性の L-form の性状の比較研究はあまりなされていない. 著者は *St. lactis* を用いて L-form を誘導し, さらにその株から塩非要求株を誘導して両者の代謝活性, 形態の差異をしらべた.

液体培地中での発育の程度を濁度によって比較すると, 塩非要求株は塩要求株よりはるかに低いことは, どの菌株についても共通していえるようである. すなわち分裂増殖能は塩非要求株になると低下するという結果である. しかしながら, 静止菌を用い, ブドウ糖を基質として単位蛋白量当りの乳酸産生能を測定した比活性で比較すると, 塩非要求株の方が高値を示す. ただしこの実験で問題となることは両者を全く同一の条件で比較することが不可能であるということである. すなわち, 塩要求株の菌体は低張の液に浮遊させると菌体が破壊されてしまうため, 塩非要求株と同様の 0.5% NaCl 含有の菌体浮遊液を用いて実験することが不可能であるから高張食塩水に浮遊させて実験を行わざるを得ない. 種々の塩濃度で塩非要求株 (N 05) について比活性を測定した場合, large cells では 0.5% の時が, small cells では 1.0% の時が最高でそれ以上塩濃度を高くすると比活性が低下する. 塩非要求株の場合は菌体を浮遊させる液の食塩濃度を 3.5% まで上げてても菌体の破壊はおきないので, この条件で比較すれば比活性は塩要求株の方が高い. この結果から塩要求株の比活性が低いのは, 浮

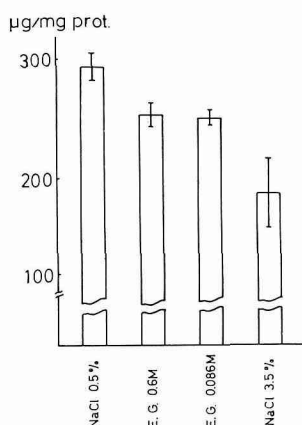


Fig. 12 Effect of NaCl and ethylene glycol on glycolysis by *St. lactis* (parent strain).

遊液の高い食塩濃度による酵素活性の阻害と考えられる。したがってこの両菌株の本質的な比活性の比較はこの実験では不可能である。

しかしながらこのことを裏付ける実験として著者は浸透圧を保持するために食塩に代えて Ethylene glycol を用い、親株の *St. lactis* の菌体を用いて、乳酸産生量の代りにブドウ糖消費量を測定した実験結果では Ethylene glycol の濃度を上げて食塩 3.5% と同じ osmolarity にしても代謝活性の阻害は認められないが、食塩を用いた場合は 3.5% のときの代謝活性は 0.5% のときのそれよりはるかに低いという結果が得られた (Fig. 12)。

L-form の菌体は塩要求株でも塩非要求株でも、その菌体の大きさは大小不同であり、その最小単位粒子というものの確認はまだしていないが、本実験においては一応大きく 3,500 r.p.m., 10 分で沈澱する菌体と、さらに 10,000 r.p.m., 30 分で沈澱する菌体とに分けて、前者を large cells, 後者を small cells として実験を試みた。ここで small cells の単位蛋白量当りの乳酸産生の比活性が large cells より高いという結果を得たのは、電顕像から平均的に測定した菌体の直径からみて、菌体単位蛋白量当りの表面積の総和の大きさが比活性の大小を左右していると考えられる結果が得られた。

5 結 語

1. *St. lactis* の L-form の塩要求株 N 35 と塩非要求株 N 05 とを比較すると至適塩濃度の培地中での発育は全培養の濁度で比較して、N 35 の最高濁度は N 05 のその約 3 倍に達しその濁度を長く保持するが、N 05 は最高濁度に達してから比較的速やかに低下する傾向がある。

2. N 35 株, N 05 株の細胞をさらに分画遠心沈澱法で

large cells と small cells に分けて、その静止菌体を用いて、それぞれの至適な食塩濃度条件の反応液中で、ブドウ糖を基質としての乳酸産生能を指標として代謝活性を比較した結果、その比活性は N 05 small cells が最も高く、N 05 large cells, N 35 small cells の順に低くなり、N 35 large cells が最も低かった。

3. この代謝活性の差異は全く同じ条件で反応させた比較ではないので、それぞれの細胞の本質的な差異とはいえない。N 35 株の活性の低いのは高濃度食塩による酵素活性の阻害といえる。また N 35, N 05 いずれも small cells の方が large cells よりも活性が高かったのは、超薄切片による電顕像観察で得られた細胞の大きさの比較の成績からみても、small cells の方が単位蛋白量当りの細胞表面積の総和が大きいこともその原因の一つとみなされる。

4. この研究で行った電顕的観察では細胞の膜構造の解析まではできないので、形態的に N 05 の細胞の低張環境に対する抵抗と膜構造の変化とを結びつけることは不可能である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、電子顕微鏡の標本作製および写真撮影に多大の御協力をいただいた北大低温科学研究所医学部門の根井外喜男教授、藤川清三助手に深く謝意を表します。

さらに実験にあたり種々有効な助言をいただいた札幌医科大学微生物学教室 前川静枝、牧野利一両助教授に深謝いたします。

(本論文の要旨は、第 44 回日本細菌学会北海道地方会において発表した)。

文 献

1. McGee, Z. A., Wittler, R. G. and Charache, P.: Wall-defective microbial variants.: Terminology and experimental design. *J. Inf. Dis.* **123**, 433-438 (1971).
2. Panos, C., Hynes, L. M. and Cohn, M.: On RNA composition and growth rate of a streptococcus and derived stable L-form. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **19**, 62-66 (1965).
3. Panos, C. and Parunak, H. V.: Effect of pH and temperature on structural integrity of an L-form of *Streptococcus pyogenes*. *Nature* **205**, 723-724 (1965).
4. Charache, P.: Cell wall-defective bacterial variants in human disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **174**, 903-911 (1970).

5. Bibel, D. J. and Lawson, J. W.: Morphology and viability of large bodies of streptococcal L-form. *Infect. Imm.* **12**, 919-930 (1975).
6. Sharp, J. T.: L colonies from hemolytic streptococci: New Technic in the study of L-form of bacteria. *Proc. Exp. Biol. Med.* **87**, 94-97 (1954).
7. Freimer, E. H., Krause, R. M. and McCarty, M.: Studies of L-forms and protoplasts of group A streptococci. I. Isolation, growth, and bacteriologic characteristics. *J. Exp. Med.* **110**, 853-873 (1959).
8. Sharp, J. T., Hijmans, W. and Dienes, L.: Examination of the L forms of group A streptococci for the group-specific polysaccharide. *J. Exp. Med.* **105**, 153-159 (1957).
9. Maekawa, S. and Hayashi, T. T. A.: L-phase variants of group A hemolytic streptococci not requiring high osmolarity. *Jap. J. Microb.* **17**, 228-229 (1973).
10. Leon, O. and Panos, C.: Adaptation of an osmotically fragile L-form of *Streptococcus pyogenes* to physiological osmotic conditions and its ability to destroy human heart cells in tissue culture. *Infect. Imm.* **13**, 252-262 (1976).
11. Gilpin, R. W. and Patterson, S. K.: Adaptation of a stable L-form of *Bacillus subtilis* to minimal salts medium without osmotic stabilizer. *J. Bact.* **125**, 845-849 (1976).
12. Fortner, J.: Ein einfaches Plattenverfahren zur Züchtung strenger Anaërobier (anaërobe Bazillen—filtrierbare anaërobe Bakterien—*Spirochaeta pallida*). *Zbl. Bakt.* **108**, 155-159 (1928).
13. Barker, S. B. and Summerson, W. H.: The colorimetric determination of Lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.* **138**, 535-554 (1941).
14. Hultman, E.: Rapid specific method for determination of aldosesaccharides in body fluids. *Nature* **183**, 108-109 (1959).
15. Hyvärinen, A. and Nikkilä, E. A.: Specific determination of blood glucose with o-Toluidine. *Clin. Chim. Act.* **7**, 140-143 (1962).
16. Dubowski, K. M.: An o-Toluidine method for body-fluid glucose determination. *Clin. Chem.* **8**, 215-235 (1962).
17. 佐々木禎一: o-Toluidine を用いる血糖の簡易定量法—特に o-Toluidine 硼酸法を中心として—。臨床病理, 臨時増刊特集, **15**, 45-54 (1968).
18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
19. Clasener, H. A. L., Ensering, H. L. and Hijmans, W.: Persistence in mice of the L-phase of three streptococcal strains adapted to physiological osmotic conditions. *J. Gen. Microb.* **62**, 195-202 (1970).
20. Fernandes, P. B. and Panos, C.: Persistence, pathogenesis, and morphology of an L-form of *Streptococcus pyogenes* adapted to physiological isotonic conditions when in immunosuppressed mice. *Infect. Imm.* **14**, 1228-1240 (1976).

Explanation of Photograph

- Photo 1** Thin section of small cells of N 05.
- Photo 2** Thin section of large cells of N 05.
- Photo 3** Thin section of small cells of N 35.
- Photo 4** Thin section of large cells of N 35.

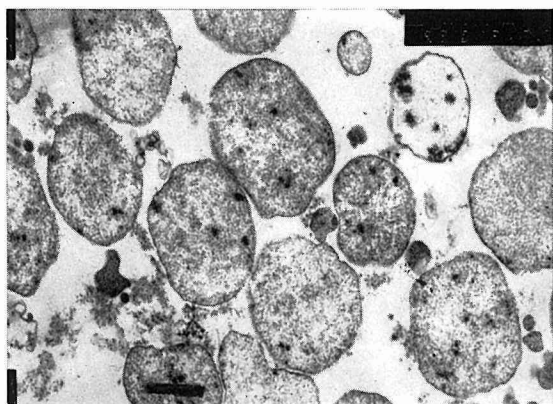


Photo 1

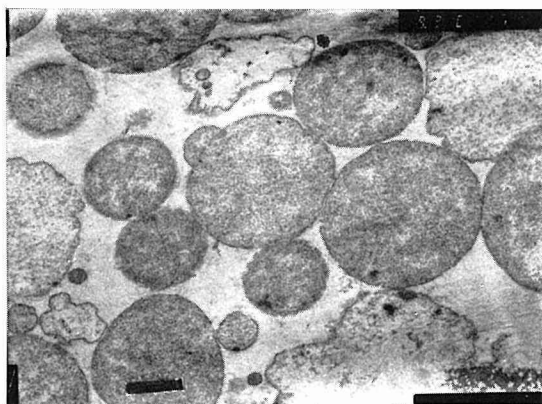


Photo 2

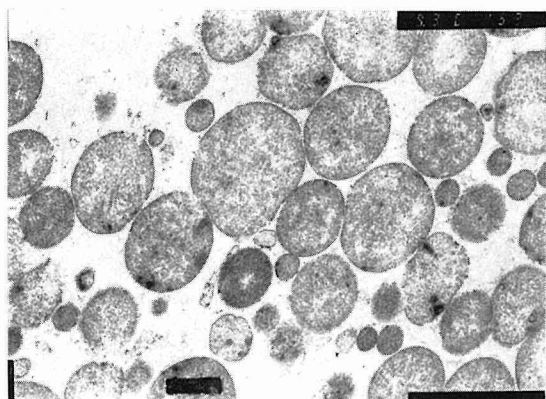


Photo 3

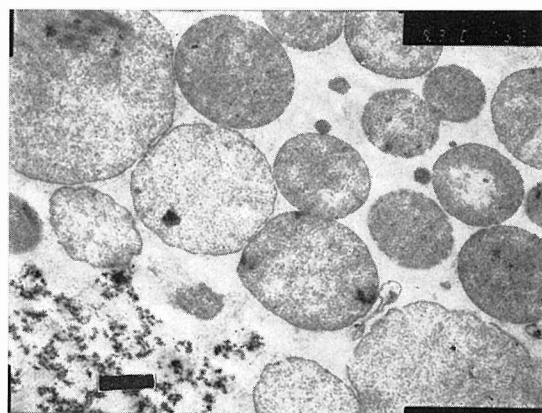


Photo 4